

**ANTI-M-CSF MONOCLONAL ANTIBODY AND HYBRIDOMA PRODUCING THE ANTIBODY****Publication number:** JP6319584**Publication date:** 1994-11-22**Inventor:** SOMOTO TOMONORI; KAWASHIMA TAKUJI; OTSUKI TETSUYA**Applicant:** MORINAGA MILK INDUSTRY CO LTD**Classification:**

**- international:** A61K39/395; C12N5/10; C12N5/20; C12N15/02; C12N15/06; C12N15/09; C12P21/08; G01N33/53; G01N33/577; C12R1/91; A61K39/395; C12N5/10; C12N5/20; C12N15/02; C12N15/06; C12N15/09; C12P21/08; G01N33/53; G01N33/577; A61K39/395; G01N33/577; (IPC1-7): A61K39/395; G01N33/577; C12P21/08; C12N5/20; C12N15/06; G01N33/53; C12P21/08; C12R1/91; C12N5/20; C12R1/91

**- European:****Application number:** JP19930106731 19930507**Priority number(s):** JP19930106731 19930507**Report a data error here****Abstract of JP6319584**

**PURPOSE:**To provide a novel monoclonal antibody useful, e.g. for various immunological tests for macrophage colony stimulating factor. **CONSTITUTION:**An anti-M-CSF monoclonal antibody recognizing the structure common between mouse M-CSF and human M-CSF, e.g. an antibody produced by the culture of hybridoma M09302 (FERM P-13618), belonging to IgG of gamma-globulin originated from rat, belonging to IgG1 subclass of IgG and having kappa-chain as L chain.

---

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平6-319584

(43) 公開日 平成6年(1994)11月22日

(51) Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 P 21/08		8214-4B		
C 1 2 N 5/20				
15/06				
		8412-4B	C 1 2 N 5/ 00	B
		9050-4B	15/ 00	C
		審査請求 未請求	請求項の数 3	OL (全 5 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平5-106731

(22) 出願日 平成5年(1993)5月7日

(71) 出願人 000006127

森永乳業株式会社  
東京都港区芝5丁目33番1号

(72) 発明者 素本 友紀

神奈川県座間市東原5-1-83 森永乳業  
株式会社生物科学研究所内

(72) 発明者 川島 拓司

神奈川県座間市東原5-1-83 森永乳業  
株式会社生物科学研究所内

(72) 発明者 大月 哲也

栃木県河内郡南河内町大字薬師寺3-311  
-1 自治医科大学内

(74) 代理人 弁理士 西澤 利夫

(54) 【発明の名称】 抗M-CSFモノクローナル抗体と、この抗体を産生  
-マ

するハイブリド

(57) 【要約】

【構成】 マウスM-CSFとヒトM-CSFの共通構造を認識する抗M-CSFモノクローナル抗体と、この抗M-CSFモノクローナル抗体を産生するハイブリド-マ。

【効果】 マウスM-CSFとヒトM-CSFをを同一の抗体で認識することが可能となり、たとえばM-CSFについての各種免疫学的試験等を行なう場合に、予め動物実験をマウスで実施し、直ちにその結果をヒトに応用することができる。

1

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 マウスM-CSFとヒトM-CSFの共通構造を認識する抗M-CSFモノクローナル抗体。

【請求項2】 マウスM-CSFとヒトM-CSFの共通構造を認識する抗M-CSFモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。

【請求項3】 ハイブリドーマがFERM P-13618である請求項2のハイブリドーマ。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 この発明は、マウスおよびヒトのマクロファージ・コロニー刺激因子 (Macrophage Colony Stimulating Factor, 以下M-CSFと記載する) を共に認識する抗M-CSFモノクローナル抗体と、この抗体を産生するハイブリドーマに関するものである。

【0002】

【従来の技術】 M-CSFは、従来より、白血球機能の促進により感染症の予防および治療に有効であること

〔ジャーナル・オブ・イムノロジー (Journal of Immunology)、第131巻、第2983ページ、1983年。ジャーナル・オブ・イムノロジー (Journal of Immunology)、第122巻、第1134ページ、1979年。ジャーナル・オブ・イムノロジー (Journal of Immunology)、第130巻、第795ページ、1983年〕およびその分化誘導活性から骨髄性白血病の治療に効果があること〔インターナショナル・ジャーナル・オブ・キャンサー (International Journal of Cancer)、第30巻、第773ページ、1982年〕等が主に知られていたが、この他にも、近年その多彩な役割が明らかになってきている。例えば、妊娠中の胎盤の維持等にM-CSFが重要な役割を果たしていること〔ネイチャー (Nature)、第330巻、第484ページ、1987年。ジャーナル・オブ・エクスペリメンタル・メディシン (Journal of Experimental Medicine)、第164巻、第956ページ、1986年。バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーション (Biochemical and Biophysical Research Communication)、第178巻、第1099ページ、1991年〕や、血管中のコレステロール代謝に重要な役割を果たしていること(特開平2-258728)、あるいは破骨細胞への影響においてその骨吸収に大きく関与していること〔ネイチャー (Nature)、第345巻、第442ページ、1990年。ジャーナル・オブ・ボーン・アンド・ミネラル・リサーチ (Journal of Bone and Mineral Research)、第5巻(別冊2、要約)、第534ページ、1990年〕等が明らかになっている。

【0003】 このように、M-CSFは個体内のほぼ全領域において種々の重要な役割を果たしている因子であるが、また一方で、マウスおよびヒトのM-CSF分子をコードしているDNAの比較からは、両者の相同性が

2

アミノ酸で78%、核酸では80%にも及ぶことが明らかになっており〔プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユナイテッド・ステーツ・オブ・アメリカ (Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America)、第84巻、第1157ページ、1987年〕、M-CSFは進化の過程で種間を越えて保存されている分子であると考えられている

【0004】。

10 【発明が解決しようとする課題】 上記のとおり、M-CSFは種間を超えて個体の維持に重要な役割を果たす分子であることが知られているが、その構造や生理活性の中心的部位等については未だ十分に解明されていない。このようなM-CSF分子の解析に当たっては、それが進化の過程で種を超えて保存されてきたという事実から、異種のM-CSFを共に認識するモノクローナル抗体を利用し、共通の抗原結合部位を解析することによって、M-CSF分子の活性構造を明らかにすることができるものと期待される。

20 【0005】 また、抗M-CSF抗体を用いて免疫学的各種試験を行う場合にも、異種のM-CSFを共に認識するモノクローナル抗体を利用することができれば、抗体の効果を予め動物実験し、その結果を直接ヒトに応用することが可能となる。このような理由から、異種のM-CSFを共に認識するモノクローナル抗体へ関心は高く、特にマウスとヒトのM-CSFは、上記のとおり一次構造レベルでの相同性が高く、しかもそれぞれのM-CSFがいずれもマウスM-CSFレセプターに結合する〔ジャーナル・オブ・セル・フィジオロジー (Journal of Cell Physiology)、第104巻、第359ページ、1980年〕ことから、抗マウス/ヒトM-CSFモノクローナル抗体の可能性が検討されてきた。

30 【0006】 しかしながら、従来報告された抗マウスM-CSFモノクローナル抗体は、ヒトのM-CSFを認識できないことが明らかにされ〔ジャーナル・オブ・イムノロジー (Journal of Immunology)、第141巻、第483ページ、1988年〕、その後も、抗マウスM-CSFモノクローナル抗体が、ヒトM-CSFを認識したという報告はない。このため、アミノ酸や核酸の配列レベルでは相同する部分の多いマウスおよびヒトM-CSFは、立体構造としてはやや異なる構造を有しているものと推定され、それらを共に認識するモノクローナル抗体の実現は困難であるとみなされてきた。

40 【0007】 この発明は、以上のとおりの事情に鑑みてなされたものであり、これまで存在しなかったマウスとヒトのM-CSFを共に認識する新しいモノクローナル抗体と、この抗体を産生するハイブリドーマを提供することを目的としている。

【0008】

50 【課題を解決するための手段】 この発明は、上記の課題

を解決するものとして、マウスM-CSFとヒトM-CSFの共通構造を認識する抗M-CSFモノクローナル抗体を提供する。またこの発明は、上記の抗M-CSFモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマをも提供する。

【0009】すなわち、この発明の発明者らは、上記の課題について検討した結果、マウスおよびヒトM-CSFが共にマウスM-CSFレセプターに高い親和性を有することに着目し、抗マウスM-CSF抗体ではヒトM-CSFを認識できなくとも、抗ヒトM-CSF抗体ではマウスM-CSFを認識できる可能性があるとの仮説のもとに鋭意研究を重ね、この発明を完成させた。

【0010】以下、この発明の構成について詳しく説明する。

#### (1) ハイブリドーマの作出

この発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの作出方法は、公知の方法[ネイチャー (Nature)、第256巻、第495ページ、1975年]に従って、たとえば次のとおりに行なうことができる。

##### 1) 動物の感作

ヒトM-CSFを抗原として使用し、これを完全フロイドまたは不完全フロイドのアジュバントと混和し、1週間から数か月の間隔でラットまたはマウス等に1〜4回程度注射し、動物を感作する。

##### 2) 細胞融合

免疫された動物から摘出した脾臓細胞またはリンパ球B細胞と骨髓腫細胞とを常法により融合させ、融合細胞を得る。骨髓腫細胞としては公知のヒポキサンチン・グアニン・ホスホリボシル・トランスフェラーゼ(Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyl Transferase、以下HGPRTと記載することがある)欠損マウスや、ラット骨髓腫細胞等を用いることができる。細胞融合を行う方法はいくつか知られているが、例えばポリエチレングリコール(以下PEGと記載することがある)を使用する方法、電気融合による方法等を用いることができる。この発明においては、これらいずれの方法でも融合細胞を得ることができる。

##### 3) 融合細胞の選択

前記の方法により得た融合細胞を適当な選択培地中で、通常2〜4日毎に新鮮な培地と交換しながら、目的とする特異抗体産生細胞を選別する。例えばHGPRT欠損骨髓腫細胞と融合されている細胞の場合には、選択培地としてヒポキサンチン・アミノプテリン・チミジン培地(HAT培地)、ヒポキサンチン・アザセリン培地(HAZ培地)等を使用することができる。選別は、固相または液相放射性同位元素免疫測定法(RIA)、酵素結合免疫測定法(ELISA)等の公知の方法により行なうことができる。

##### 4) クローニング

前記で選別した特異抗体産生細胞を、一つのクローンか

ら由来した均一な細胞集団とするため、公知の限外希釈法等を用いて、クローニング操作を行い、抗M-CSFモノクローナル抗体を安定に産生する細胞株、いわゆるハイブリドーマを得る。

【0011】以上のようにして得られたハイブリドーマは、マウスM-CSFとヒトM-CSFの共通構造を認識する抗M-CSFモノクローナル抗体を産生するという機能的特徴を有している。その代表的な例として、ラットの脾臓細胞とラットの骨髓腫細胞とを融合して得たハイブリドーマを、ハイブリドーマMO9302と命名し、通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託し、FERM P-13618なる受託番号を得た。

【0012】このハイブリドーマMO9302は、次の性質を有している。

a) 由来: ラット脾臓細胞(Louラット: 実験動物中央研究所から入手)とラット骨髓腫細胞(Y3Ag1.2.3)[ネイチャー (Nature)、第277巻、第131ページ、1979年]との融合細胞であるハイブリドーマ

20 b) 形態: 非紡錘形であり、ほぼ球形を呈する

c) 継代培養: 可能

d) 機能的特徴: マウスM-CSFとヒトM-CSFの共通構造を認識する抗M-CSFモノクローナル抗体を産生する

e) 細胞増殖性: 付着および浮遊の双方において良好

f) 保存条件: 10% (重量) DMSO, 90% (重量) FCS中で-80℃以下で保存する

g) 血清要求性: 通常10% (重量) FCS添加培地で培養する

30 (2) 抗体の取得

この発明の抗体は、前記ハイブリドーマを組織培養フラスコで無血清培地、血清を含む通常の動物細胞用培地等で培養した培養上清から、または2, 6, 10, 14-テトラメチルペンタデカン(プリスタン)を予め投与したマウス等の動物にこのハイブリドーマを接種し、生体内培養することによって得られた生体滲出液から公知の方法により精製される。すなわち得られた培養上清または生体滲出液を通常の蛋白精製に用いられる生化学的手法、たとえば硫酸アンモニウムによる塩沈法、カラムクロマトグラフィー等により精製することができる。

【0013】この発明の抗体は、このようにして得られたいくつかのモノクローナル抗体のうち、ELISA法を用いてマウスM-CSFおよびヒトM-CSFに共通して反応することが確認されたラット由来の抗体であることを特徴としている。以上のようにして得られたこの発明のモノクローナル抗体は、次に示す理化学的性質を有している。

①ラット由来のγ-グロブリンのIgGに属する

②IgGのIgG<sub>1</sub>サブクラスに属する

50 ③L鎖としてκ鎖を有する

この発明のモノクローナル抗体は、免疫学的各種実験、例えば抗原抗体反応を利用したM-CSFの定量法、免疫組織染色、ウエスタン・ブロッティング等に使用することができるが、特にこれらに限定されるものではない。

【0014】次に試験例を示してこの発明の作用効果を実証する。

#### 試験例1

この試験は、この発明のハイブリドーマが産生する抗体のヒトM-CSFとの反応性を調べるために行った。実施例2と同一の方法により製造したこの発明の抗体を100 $\mu$ g/mlの濃度でELISA用プラスチックプレート(ヌンク社製)に吸着させ、非特異反応を防止するためのブロッキング操作を行った。次に、特開昭64-22899号公報の実施例1記載の方法により人尿から調製したヒトM-CSFを、7.8~125U/mlの濃度で前記プラスチックプレートに添加し、37℃で2時間抗原抗体反応を行わせた。のち抗ヒトM-CSFポリクローナル抗体を37℃、1時間反応させ、さらにホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)結合抗ラビットIgG(ジャクソン社製)を反応させた。HRPに対応する基質として、3,3',5,5'-テトラメチルベンチジン(以下TMBと記載することがある)を用い、室温で30分反応させ、1Mリン酸を用いて反応を停止し、プレートリーダー(バイオ・ラッド社製)を用いて450nmの吸光度を測定した。

【0015】この試験の結果は、図1に示すとおりである。図1の縦軸および横軸は、それぞれ吸光度および濃度を示す。図1から明らかなように、この発明のハイブリドーマが産生する抗体は、ヒトM-CSFと反応し、しかも7.8~125U/mlの濃度範囲において濃度に比例して吸光度が増加し、良好な直線関係の得られることが認められた。

#### 試験例2

この試験は、この発明のハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体のマウスM-CSFとの反応性を調べるために行った。

【0016】実施例2と同一の方法により製造したこの発明の抗体を100 $\mu$ g/mlの濃度でELISA用プラスチックプレート(ヌンク社製)に吸着させ、非特異反応を防止するためのブロッキング操作を行った。次に、スタンレーの方法[ジャーナル・オブ・バイオリジカル・ケミストリー(Journal of Biological Chemistry)、第252巻、第4305ページ、1977年]により調製したマウスM-CSFを7.8~500U/mlの濃度で前記プラスチックプレートに添加し、37℃で2時間抗原抗体反応を行わせた。のち、既にマウスM-CSFと反応することが明かとなっている抗ヒトM-CSFポリクローナル抗体[バイオキミカ・バイオフィジカ・アクタ(Biochimica Biophysica Acta)、第11

36巻、第297ページ、1992年]を、37℃で1時間反応させ、さらにホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)結合抗ラビットIgG(ジャクソン社製)を反応させた。HRPに対応する基質として、TMBを用い、室温で30分反応させ、1Mリン酸を用いて反応を停止し、プレートリーダー(バイオ・ラッド社製)を用いて450nmの吸光度を測定した。

【0017】この試験の結果は、図2に示すとおりである。図2の縦軸および横軸は、それぞれ吸光度および濃度を示す。図2から明らかなように、この発明のハイブリドーマが産生する抗体は、マウスM-CSFと反応し、しかも7.8~500U/mlの濃度範囲において濃度に比例して吸光度が増加し、良好な直線関係の得られることが認められた。

【0018】次に実施例を示してこの発明をさらに詳述するが、この発明は以下の実施例に限定されるものではない。

#### 【0019】

##### 【実施例】

#### 20 実施例1(ハイブリドーマの作出)

##### (1) 動物の免疫

生理食塩水で希釈したヒトM-CSFとフロイドの完全アジュバントとの1:1のエマルジョンを調製し、5~8週齢の雌のLouラット(実験動物中央研究所から入手)の背部皮下および腹腔に、ラット一匹当たりM-CSFとして100~200 $\mu$ g(エマルジョン量として0.5~1.0ml)を投与した。追加免疫はフロイドの不完全アジュバントを用いて2~3週間毎に行い、M-CSF投与量は1匹当たり50~100 $\mu$ gとした。追加免疫終了1週間目に採血し、血清中の抗体価をELISA法により測定し、抗体価の上昇がプラトーに達し、さらにELISA法での抗体価がコントロールに比較して数万から数十万倍と十分に高い抗体価が認められるまで追加免疫を行った。

##### (2) 細胞融合

高抗体価が認められたラット2匹にM-CSF溶液を1匹当たり100 $\mu$ gの割合で腹腔内投与し、4日後に脾臓を摘出した。ラット骨髓腫細胞(Y3Ag1.2.3)[ネイチャー(Nature)、第277巻、第131ページ、1979年]と前記ラット脾細胞とを細胞数比で1:5の割合でPEG1500を用いて融合した。10%(重量)FBS含有DMEM培地(大日本製薬社製)を用いてPEGを洗浄除去し、細胞をHAT培地(シグマ社製)に懸濁し、96穴プレート(ヌンク社製)に約10<sup>5</sup> cells/ウエルずつ分注し、37℃、7%CO<sub>2</sub>下で7日間培養した。

##### (3) スクリーニングおよびクローニング

前記ハイブリドーマの増殖を終了した各ウエルの培地を一部採取し、常法により抗体産生活性のスクリーニングを行い、抗原に対して高い力価が認められるウエルにつ

いて限界希釈法によりクローニングを行った。ラット腹腔渗出細胞をフィーダー細胞として用い、コロニー形成ウエルの培養上清の抗体価をELISA法により測定し、抗体産生の認められたウエルについて、前記と同様の方法により再度クローニングを行い、さらに前記と同様の方法により培養し、産生された培養上清に含まれる抗体の性質をELISA法により試験し、マウスM-CSFにも反応する抗ヒトM-CSFモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマMO9302を作出した。

実施例2 (モノクローナル抗体の取得)

実施例1で得たハイブリドーマ(MO9302)  $1 \times 10^5$  を、無血清培地(味の素社製。ASF104) 50 mlで培養し、得られた培養上清50 mlを市販のIgG精製用アフィニティ担体であるprotein G Sepharose ff (ファルマシア社製) 7 mlを充填したカラムに流速2 mlで通液して吸着させ、のち担体の5倍量のリン酸緩衝生理食塩水で洗浄し、0.02 Mグリシン塩酸緩衝液(pH 2.5)で吸着画分を溶出させた。前記一連の

操作を反復し、1, 100 mlの培養上清から約63 mgの抗体を得た。

【0020】

【発明の効果】以上詳しく説明したとおり、この発明によって以下の効果が奏せられる。

(1) マウスおよびヒトのM-CSFを同一の抗体により認識することが可能となる。

(2) マウスM-CSFとヒトのM-CSFの共通構造を認識する抗M-CSFモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマが提供される。

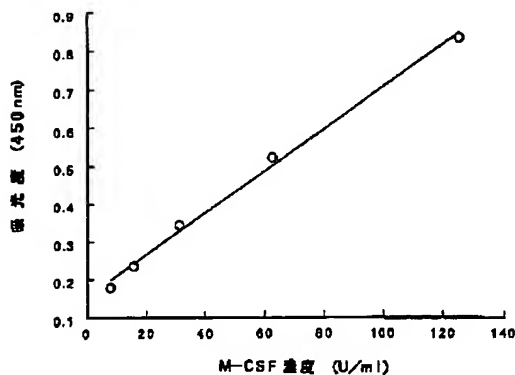
(3) この発明の抗M-CSFモノクローナル抗体を用いて、予め動物実験をマウスで実施し、直ちにその結果をヒトに応用することができる。

【図面の簡単な説明】

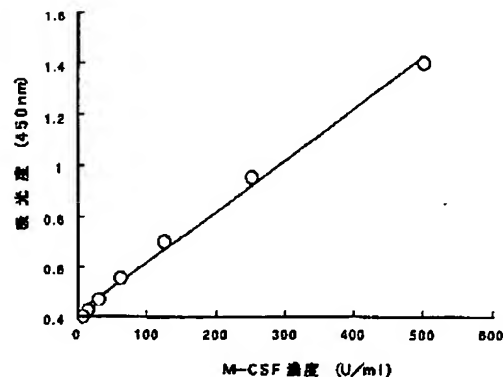
【図1】この発明の抗体とヒトM-CSFとの反応におけるヒトM-CSF濃度と吸光度との関係を示す。

【図2】この発明の抗体とマウスM-CSFとの反応におけるマウスM-CSF濃度と吸光度との関係を示す。

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(51)Int. Cl. 5	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/53		D 8310-2 J		
// A 6 1 K 39/395		U 9284-4 C		
G 0 1 N 33/577		B 8310-2 J		
(C 1 2 P 21/08				
C 1 2 R 1:91)				
(C 1 2 N 5/20				
C 1 2 R 1:91)				